

FACULTAD DE MEDICINA. GRADO EN MEDICINA  
TRABAJO DE FIN DE GRADO-MÁSTER.



# ***CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA EN VARÓN***

Francisco Manuel Fernández Gómez  
Tutor: Dr. Rogelio González Sarmiento

Mayo 2017



## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>9</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>18</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>19</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>22</b>
ANEXO 1: Extracción de DNA genómico.....	22
ANEXO 2: Protocolo de realización de PCR para estudio de BRCA1 .....	23
ANEXO 3: Protocolo de realización de PCR para estudio de BRCA2 .....	26
ANEXO 4: Análisis de grandes alteraciones genómicas mediante MLPA.....	30
ANEXO 5: Clasificación TNM del cáncer de mama de la UICC .....	36



## ABREVIATURAS

BRCA1: gen supresor de tumores (*Breast Cancer 1*)

BRCA2: gen supresor de tumores (*Breast Cancer 2*)

CD: carcinoma ductal

CDI: carcinoma ductal infiltrante

CHEK2: gen de la quinasa de control 2 (*Checkpoint Kinase 2*)

CMV: cáncer de mama en varón

CYP17: gen del citocromo P450, familia 17

DNA: ácido desoxirribonucleico (*Desoxirribonucleic Acid*)

HER2: gen del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*Human Epidermic Growth Factor Receptor 2*)

MLPA: amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

TNM: sistema de estadificación del cáncer “*Tumor Node Metastasis*”

## RESUMEN

El cáncer de mama en varón es una entidad poco frecuente y poco caracterizada y en la clínica habitual se considera a efectos de tratamiento y pronóstico como el cáncer de mama en mujer.

Para saber más sobre esta entidad, nos hemos propuesto realizar un estudio descriptivo del cáncer de mama en varón en nuestro entorno. Para ello hemos revisado las historias clínicas de 46 pacientes diagnosticados de cáncer de mama en la Unidad de Consejo Genético de Cáncer Hereditario del Centro de Investigación del Cáncer, y hemos estudiado los genes BRCA1 y BRCA2 de dichos pacientes mediante secuenciación masiva.

El 48% de los pacientes tenía antecedentes de cáncer de mama, y el 93% de los pacientes fueron diagnosticados de carcinoma ductal infiltrante. El 23% de los pacientes presentaron un grado de proliferación tumoral bajo, mientras que el 77% presentaron un grado de proliferación medio-alto. Todos los pacientes padecían un carcinoma de mama subtipo luminal, siendo el 55% de ellos luminal A y el 45% restante luminal B. En el 21% de los pacientes se hallaron mutaciones en los genes BRCA, siendo el 86% de ellas mutaciones patogénicas en BRCA2 y el 14% restante variantes de significado incierto en BRCA1.

Los pacientes con CMV de nuestra área geográfica son similares a los de otras zonas; sin embargo, presentan mayor grado de proliferación tumoral y mayor expresión de receptores hormonales que el cáncer de mama en mujer. Asimismo, parece ser que las formas familiares en varones están más ligadas a BRCA2 que sus homólogas en mujeres.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es una de las enfermedades oncológicas más prevalentes tanto a nivel mundial como a nivel nacional. Representa el 19,2% de todos los tumores malignos en el planeta. Su incidencia mundial es de 43,1 nuevos casos por 100.000 habitantes y año, siendo el cáncer más prevalente a nivel mundial ya que lo padece un 0,23% de la población mundial; sin embargo, su mortalidad es más baja, de sólo 6,4 casos por 100.000 habitantes y año. (1)

De todos estos casos, aproximadamente entre el 0,5-1% de ellos se producen en varones (2), por lo cual es considerada una enfermedad rara y poco estudiada. Por ello, están muy poco caracterizados y son considerados en la clínica habitual de la misma forma que sus homólogos en mujeres postmenopáusicas. (3)

La edad media descrita de diagnóstico del cáncer de mama en varón es entre los 60 y los 70 años. Entre los factores de riesgo que se han asociado a la aparición del cáncer de mama en varón se encuentran los antecedentes personales o familiares de cáncer de mama, la edad avanzada, la mutación de BRCA1 o BRCA2 (asociadas al síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario, en mayor proporción de casos está alterado BRCA2), la obesidad, la influencia hormonal, tanto interna (como en el síndrome de Klinefelter) como externa (uso de estrógenos o progesterona), y la exposición a radiaciones ionizantes. Asimismo, otras mutaciones como la mutación de los genes CYP17, CHEK2 o del receptor de andrógenos se están investigando por su posible relación con este tipo de tumores. (2)

Asimismo, se ha descrito en algunos casos la simultaneidad con procesos neoplásicos en otras localizaciones. Las diferentes teorías señalan asociaciones del cáncer de mama en varón con leucemia, cáncer de páncreas y tumores del tubo digestivo, aunque estas asociaciones no se han confirmado. Además, en un 1% de los casos descritos la afectación del cáncer de mama era bilateral. (2)

Anatomopatológicamente, el tipo más común de cáncer de mama en varón es el carcinoma ductal (CD), aunque también se han descrito otras formas, como el carcinoma papilar o el mucinoso. (2,4) Tanto las rutas de diseminación metastática como la estadificación TNM se realizan igual que en los casos descritos en la mujer.

Como factores pronósticos, son fundamentales el estadio de la enfermedad (TNM), el tipo y grado histológico del tumor, y su caracterización molecular. Mediante la determinación de receptores hormonales (de estrógenos y progesterona) y la presencia de HER2 en la superficie de las células tumorales podemos clasificar los carcinomas de mama en luminales (A ó B), HER2-positivos o triple negativos, lo que condiciona en gran medida tanto el tratamiento como el pronóstico. La supervivencia descrita de estos pacientes es similar a la de las mujeres con cáncer de mama.

El tratamiento del cáncer de mama en varón es inicialmente el manejo local mediante cirugía, preferiblemente mastectomía. Si se detecta presencia de enfermedad en los bordes quirúrgicos, se añadirá al tratamiento radioterapia local. Además, de forma adyuvante se instaurará hormonoterapia y/o quimioterapia en función de la estratificación del riesgo de cada paciente, dando hormonoterapia a pacientes de bajo riesgo y con tumores que expresen receptores hormonales, quimioterapia a los de alto riesgo y valorando de forma individualizada si el riesgo es intermedio. A esto se añadirá trastuzumab o pertuzumab si el tumor posee amplificación en superficie de los receptores HER2. (2,5,6)



## JUSTIFICACIÓN

Dado que los casos de cáncer de mama en varón están escasamente caracterizados debido a su baja prevalencia, decidimos realizar un estudio descriptivo de este tipo de neoplasia para conocer mejor tanto sus características clínicas como moleculares en nuestra zona geográfica.

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es:

1. Realizar un estudio retrospectivo descriptivo de los pacientes varones con cáncer de mama de la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología Médica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Los objetivos secundarios son:

2. Comparar las características de los pacientes varones de la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología Médica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca con las características descritas de los pacientes de otras zonas geográficas.
3. Comparar las características de los pacientes varones con cáncer de mama de la Unidad de Consejo Genético de Cáncer Hereditario del Centro de Investigación del Cáncer con las características descritas de las pacientes mujeres de la misma Unidad.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Revisión de historias clínicas

Hemos recogido los datos clínicos de 51 casos de varones diagnosticados de cáncer de mama desde el año 2000 en la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología Médica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca mediante revisión de sus historias clínicas. De ellas, hemos recogido las siguientes variables:

- Antecedentes de cáncer de mama en familiares de 1er o 2º grado
- Antecedentes de cáncer de ovario en familiares de 1er o 2º grado
- Fecha de nacimiento
- Edad al diagnóstico de CMV
- Diagnósticos oncológicos asociados
- Diagnóstico anatomopatológico
- Grado tumoral
- Clasificación TNM
- Estadificación del tumor
- Tamaño tumoral
- Expresión de receptores estrogénicos
- Expresión de receptores de progesterona
- Expresión de HER2
- Activación de p53
- Grado de proliferación (estimado mediante el Ki-67)
- Subtipo tumoral
- Evolución del paciente

### 2. Estudio de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2

De los pacientes se obtuvieron, siempre con su consentimiento informado, muestras de sangre para realizar el estudio de los genes BRCA1 y BRCA2.

- Extracción de DNA

El DNA genómico se extrajo a partir de sangre periférica de los pacientes siguiendo el método de Sambrook (7) (Anexo 1).

- Amplificación mediante PCR del DNA genómico

Se amplificaron los exones 2 al 24 del gen BRCA1 y los exones 2 al 27 del gen BRCA2 según los protocolos de PCR del laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (Anexos 2 y 3).

- Secuenciación automática

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador ABI 377 (AppliedBiosystems) en el Servicio de Secuenciación del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

Para la preparación de las muestras, éstas se separaron en geles de agarosa y se purificó el fragmento mediante el reactivo comercial “High Pure Product Purification Kit” (Roche). Este reactivo se basa en la capacidad del DNA de unirse a membranas de sílice en presencia de sales caotrópicas: en primer lugar el producto de PCR o el fragmento de agarosa que lo contiene se disuelven en una solución tampón con isotiocianato de guanidina. El DNA queda retenido en la superficie de sílice de la matriz mientras el resto de los compuestos son eluidos a través de la columna al centrifugar. Después el DNA se lavó con un tampón que contiene etanol y finalmente se eluyó con una solución tampón de baja concentración salina.

Se preparó una muestra con el cebador sentido y otra con el cebador antisentido a una concentración de 3 pmol cada uno en un volumen de 2  $\mu$ L. El DNA se preparó a una concentración de 40 – 60 ng para un volumen final de 8  $\mu$ L, tras lo que se secuenció por método de Sanger.

- Análisis de grandes alteraciones genómicas mediante MLPA

Para el estudio de grandes pérdidas/amplificaciones genómicas de los genes BRCA1 y BRCA2 se empleó la técnica de amplificación por PCR multiplex dependiente de ligación (MLPA). (Anexo 4).

### **3. Tratamiento estadístico de los datos**

Tras la adquisición de todos los datos, se tabularon todos ellos mediante el software informático Microsoft Excel 2016 y se realizó un análisis estadístico descriptivo de los mismos mediante el software estadístico SPSS Statistics 24.

## RESULTADOS

De los 51 pacientes iniciales se perdieron 5 pacientes por no estar reflejadas en la historia clínica las variables que recogíamos en este estudio. Se codificaron las variables para un mejor procesamiento de los datos.

De los 46 pacientes restantes se analizaron las variables clínicas que mostramos en la tabla 1.

**Tabla 1. Frecuencias de presentación de las variables de antecedentes clínicos estudiadas en los pacientes de CMV**

	Presente	Ausente	Pérdidas
Antecedentes de cáncer de mama en familiares de 1er o 2º grado	18 (48,6%)	19 (51,4%)	9
Antecedentes de cáncer de ovario en familiares de 1er o 2º grado	1 (2,7%)	36 (97,3%)	9
Diagnósticos oncológicos asociados	4 (8,7%)	42 (91,3%)	0
Bilateralidad del CMV	2 (4,3%)	44 (95,7%)	0

- Antecedentes de cáncer de mama en familiares de 1er o 2º grado

Existían antecedentes familiares de cáncer de mama en un 48,6% de los pacientes, frente a un 51,4% que no tenían dichos antecedentes. En 9 casos estos antecedentes no constaban en la historia clínica, por lo que han sido considerados pérdidas.

- Antecedentes de cáncer de ovario en familiares de 1er o 2º grado

Existían antecedentes familiares de cáncer de ovario en el 2,7% de los pacientes, frente a un 97,3% que no tenían dichos antecedentes. En 9 casos estos antecedentes no constaban en la historia clínica, por lo que han sido considerados pérdidas.

- Diagnósticos oncológicos asociados

En el 8,7% de los pacientes existían neoplasias asociadas al CMV, frente a un 91,3% que sólo padecían CMV. En 2 de los casos el diagnóstico oncológico asociado fue el de carcinoma colorrectal, mientras que en el caso restante fue el de adenocarcinoma prostático.

- Bilateralidad del CMV

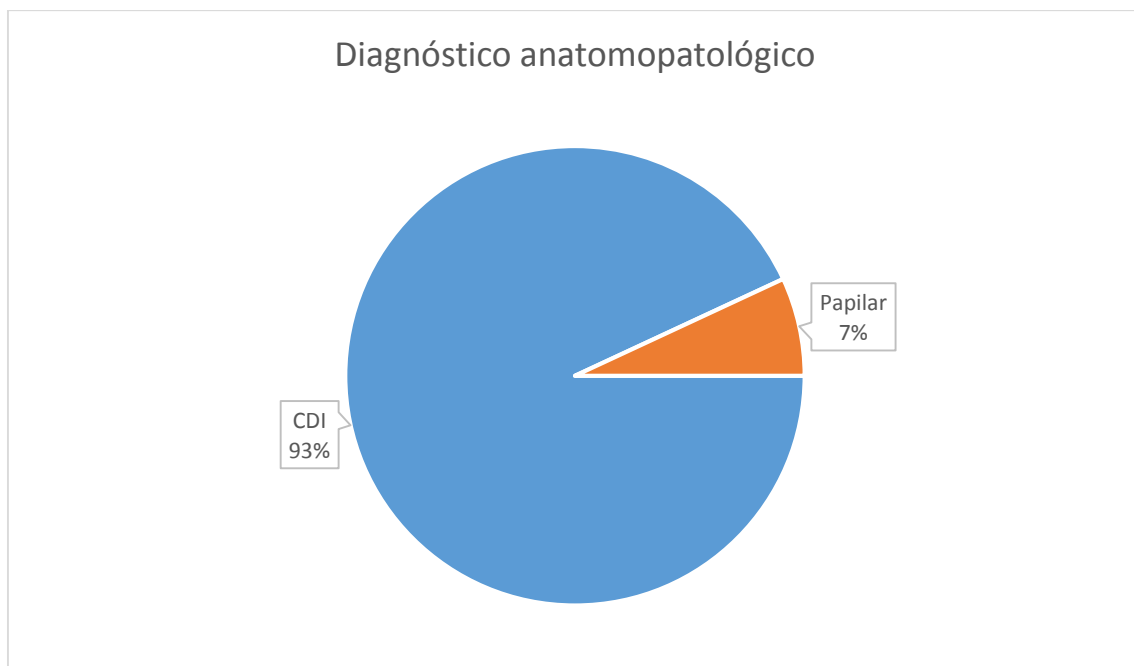
En un 4,3% de los pacientes el CMV fue bilateral, mientras que en el 95,7% restante fue unilateral.

- Edad al diagnóstico de CMV

La edad al diagnóstico de CMV osciló entre los 47 y los 90 años, siendo la edad media al diagnóstico de 67 años. La desviación típica fue de 10,37 años.

- Diagnóstico anatomopatológico

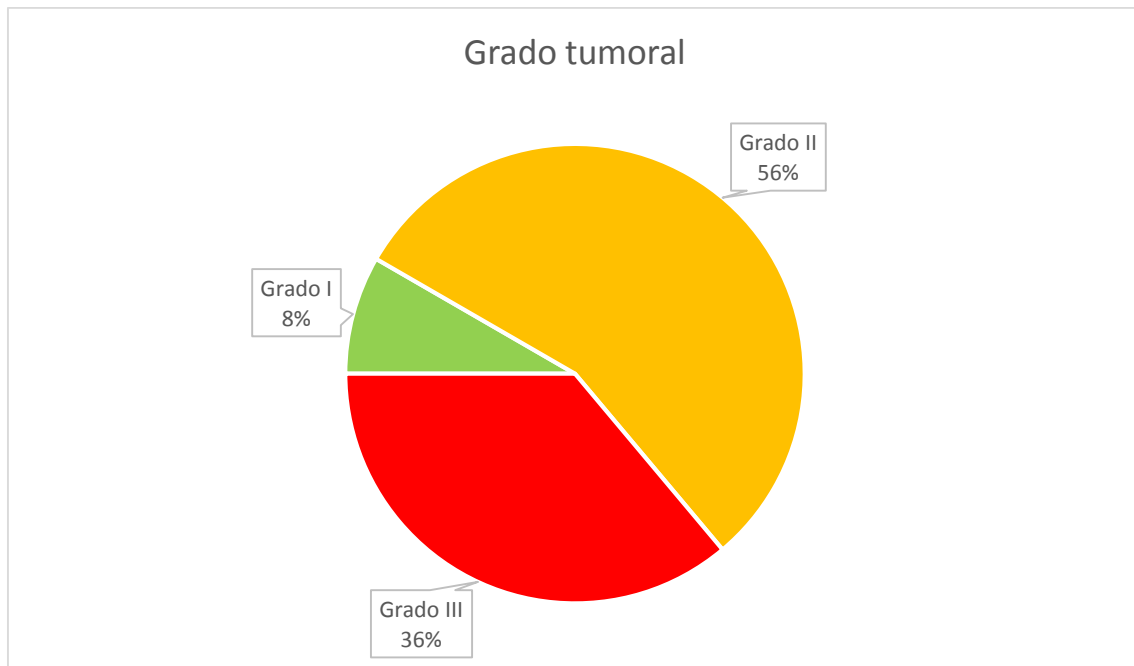
El 93,5% de los pacientes (43 casos) fueron diagnosticados de carcinoma ductal infiltrante (CDI), mientras que los 3 pacientes restantes (6,5%) fueron diagnosticados de carcinoma papilar, tal y como se muestra en la figura 1.



**Figura 1: Distribución porcentual del diagnóstico anatomopatológico en nuestros pacientes con CMV. (n=46)**

- Grado tumoral

De todos los pacientes analizados, en 3 casos el diagnóstico fue de CMV grado I, 20 pacientes fueron diagnosticados de CMV grado II y otros 13 pacientes se diagnosticaron como CMV grado III, tal y como se muestra en la figura 2. En 10 casos no constaba el grado histológico en la historia clínica, por lo que se consideraron pérdidas.



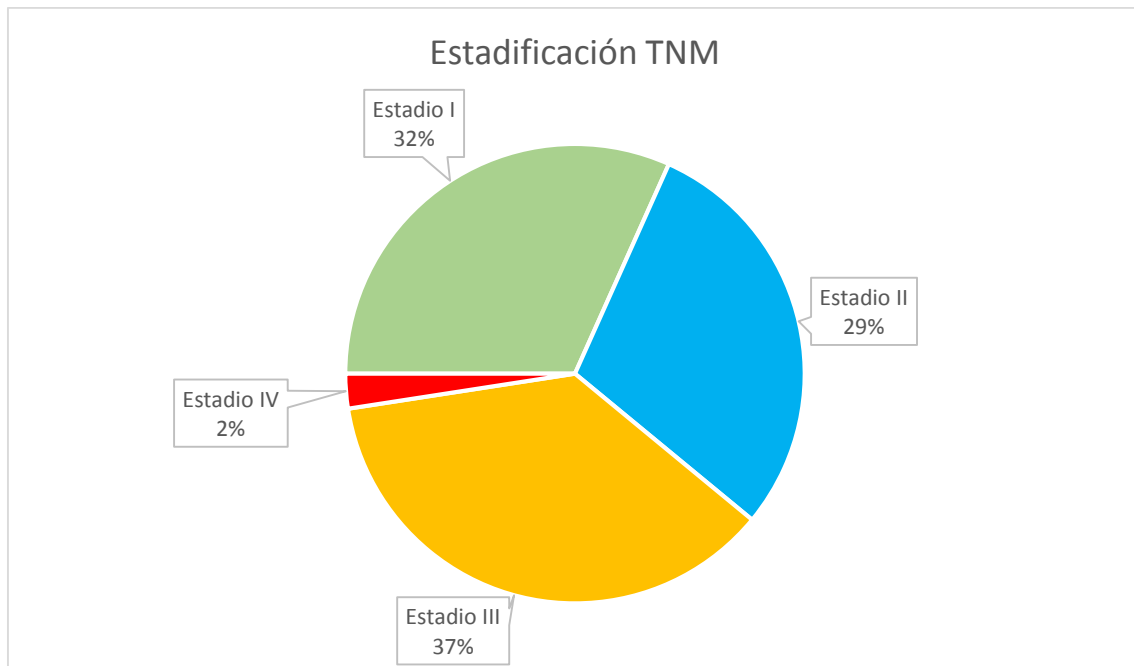
**Figura 2: Distribución porcentual del diagnóstico del grado tumoral (n=36)**

- **Tamaño tumoral**

El tamaño de los tumores primarios osciló entre 1 y 7 cm de diámetro, siendo la media de 2,52 cm y la desviación típica de 1,42 cm.

- **Estadificación del tumor**

Tras la estadificación según los criterios TNM para el cáncer de mama (Anexo 4), 13 pacientes padecían un CMV estadio I, 12 pacientes padecían un CMV estadio II, 15 pacientes padecían un CMV estadio III y 1 paciente padecía un CMV estadio IV, tal y como se muestra en la figura 3. En 5 casos no figuraba la estadificación TNM en la historia clínica, por lo que se consideraron pérdidas en esta variable.



**Figura 3: distribución porcentual de la estadificación diagnóstica de nuestros pacientes con CMV (n=41)**

- Expresión de receptores hormonales

Se consideraron “receptores hormonales positivos” si la muestra presentaba tinción inmunohistoquímica con anticuerpos frente a receptores de estrógenos o de progesterona. El 100% de los pacientes estudiados presentaron expresión de receptores hormonales, mientras que los 11 casos restantes fueron considerados pérdidas para esta variable por ausencia de datos en la historia clínica, tal y como se recoge en la tabla 2.

- Expresión de HER2

Se consideró que existía expresión de HER2 si mediante inmunohistoquímica se observaba expresión de dicho receptor. HER2 se expresó en un 8,8% de los pacientes, frente a un 91,2% con ausencia del receptor. En 12 casos no existía información sobre esta variable en la historia clínica, por lo que fueron considerados pérdidas, tal y como se recoge en la tabla 2.

- Activación de p53

Se consideró que p53 estaba activado en las células tumorales de los pacientes si se expresaba tras inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-p53. En el 43,7% de los pacientes esta reacción fue positiva, mientras que el 56,3% restante expresaban p53. En 21 casos no estaba recogida esta variable en la historia clínica, por lo que fueron considerados pérdidas, tal y como se recoge en la tabla 2.

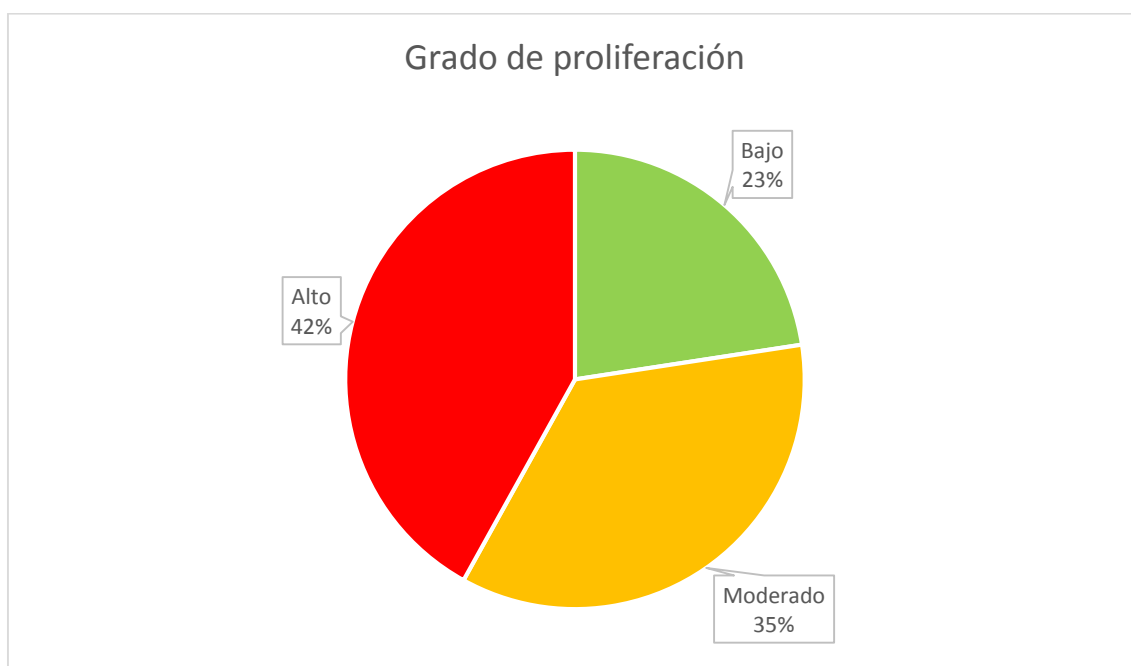


**Tabla 2: Frecuencias de presentación de las variables moleculares estudiadas en los pacientes de CMV**

	Positiva	Negativa	Pérdidas
Expresión de receptores hormonales	35 (100%)	0 (0%)	11
Expresión de HER2	3 (8,8%)	31 (91,2%)	12
Activación de p53	9 (43,7%)	16 (56,3%)	21

- Grado de proliferación

El grado de proliferación tumoral fue estimado mediante el estudio por inmunohistoquímica de Ki-67, que expresa el porcentaje de células en división por campo de microscopía óptica. Se codificó esta variable en “bajo” (<15%), “moderado” (15-30%) y “alto” (>30%), resultando que 7 de los pacientes tenían un índice de proliferación bajo, 11 pacientes tenían un índice de proliferación moderado y 13 pacientes tenían este índice alto, tal y como se muestra en la figura 4. En 15 casos esta variable no estaba recogida en la historia clínica, por lo que fueron considerados pérdidas.

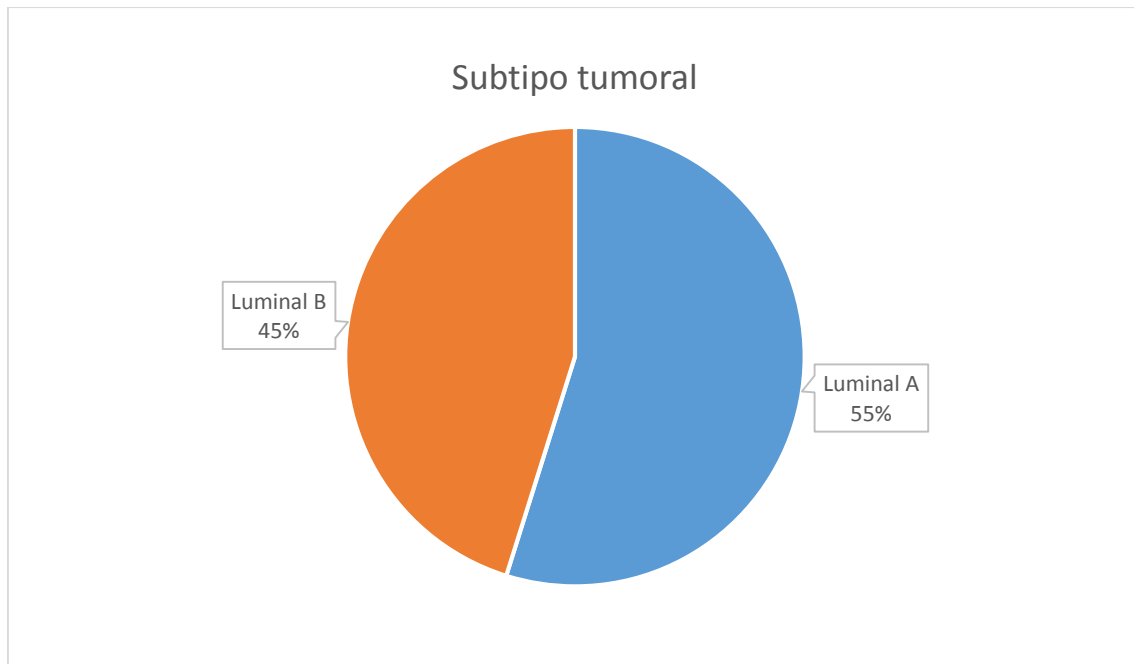


**Figura 4: Frecuencia de presentación de los diferentes grados de proliferación tumoral en los pacientes con CMV. (n=31)**

- Subtipo tumoral

Tras los estudios de expresión de receptores hormonales, de HER2 y del índice de proliferación, se clasificaron en diferentes subtipos según las características de éstos. 31 casos fueron clasificados como subtipo luminal, siendo 17 pacientes clasificados como luminal A y 14 pacientes clasificados como luminal B, tal y como se muestra en la figura

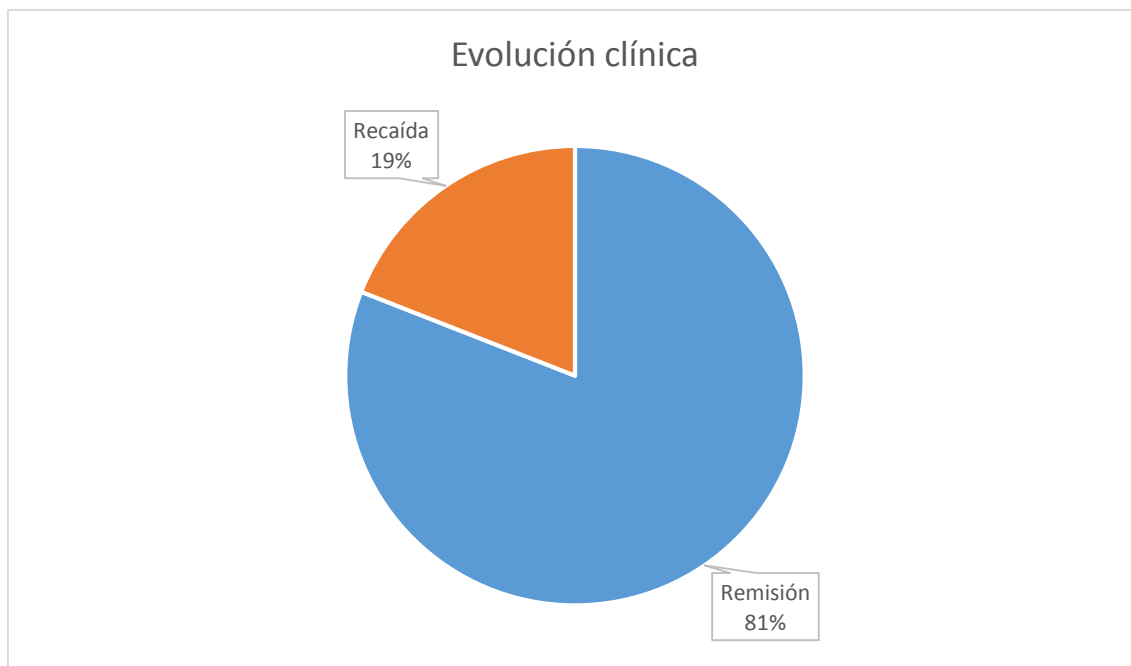
5. Los 15 pacientes restantes fueron considerados pérdidas en esta variable, ya que en sus historias clínicas no figuraba la misma. No se encontraron tumores englobados dentro del grupo de triples negativos o basal-like.



**Figura 5: Frecuencia de presentación de los diferentes subtipos tumorales de cáncer de mama en nuestros pacientes con CMV. (n=31)**

- Evolución del paciente

Se revisó en las historias clínicas la evolución del paciente, codificándolo como recaída si se incrementaba la actividad de la enfermedad tumoral o como remisión si ésta descendía. De nuestros pacientes, 34 se mantuvieron en remisión hasta el momento del estudio, mientras que 8 recayeron, tal y como se muestra en la figura 6. En 4 pacientes no se registró en la historia clínica ningún tipo de seguimiento, por lo que fueron considerados pérdidas en esta variable.



**Figura 6: Frecuencia de presentación de las posibles evoluciones del CMV en nuestros pacientes. (n=42)**

- Caracterización de los genes BRCA1 y BRCA2

En 34 de los pacientes fue posible estudiar los genes de la familia BRCA, realizándose en 29 de ellos el estudio de ambos genes, en 4 sólo estudio de BRCA2 y en 1 un estudio de mutaciones puntuales. En 12 de los casos no estaba recogido la realización del estudio o sus resultados, por lo que se consideraron pérdidas para esta variable.

De los 34 pacientes caracterizados, en 27 de ellos (79%) no se encontró mutación alguna, mientras que en los 7 casos restantes (21%) se hallaron las mutaciones descritas en la tabla 3.

**Tabla 3: Mutaciones halladas en los pacientes de la Unidad de Consejo Genético del Centro de Investigación del Cáncer**

Mutación génica	Mutación proteica	Exón	Gen	Significado	Frecuencia
c.3036_3039delACAA	p.stop958	11	BRCA2	Mutación patológica	3
c.9011A>G	p.3004L>R	23	BRCA2	Mutación patológica	1
c.2431T>C	p.771L>S	11	BRCA1	Variante de significado incierto	1
c.373G>T	p.49E>X	3	BRCA2	Mutación patológica	1
c.9520T>C	p.3098Y>H	25	BRCA2	Mutación patológica	1

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son similares a los estudios ya publicados sobre el cáncer de mama en varón.

No obstante, encontramos diferencias notables con respecto a los casos de cáncer de mama en mujer diagnosticados en la Unidad de Consejo Genético del Servicio de Oncología del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, así como con los descritos en las diferentes publicaciones sobre el tema.

Aunque la entidad descrita de forma más frecuente en el cáncer de mama familiar en mujer es el carcinoma ductal (al igual que en varón), lo es en menor medida (un 67,2% en mujer frente al 93,5% en nuestro estudio), y existe mayor heterogeneidad diagnóstica, habiendo sido descritos carcinomas lobulillares o medulares (8). Si bien es cierto que el tamaño muestral de nuestro estudio es reducido, este hecho no explica de forma satisfactoria la diferencia existente en cuanto a diferencia diagnóstica.

Asimismo, el grado tumoral también expresa diferencias porcentuales con los estudios realizados previamente sobre carcinoma de mama familiar. En éstos también lo más frecuente es el carcinoma grado II, pero con una distribución de frecuencias más homogénea a la obtenida en nuestro estudio, destacando sobre todo un mayor diagnóstico de carcinoma grado I en mujeres (25,1%) frente a los hallados en nuestro estudio en varones (8,3%) (8). La media de tamaño tumoral es menor a la descrita en otros estudios en mujeres (3,2 cm en mujeres frente a 2,5 cm en nuestros pacientes) (9). Sin embargo, en nuestro estudio el diagnóstico se corresponde con estadios más avanzados que en los casos descritos en mujeres (89% de los casos descritos en mujeres en estadios I y II, frente al 61% de los pacientes de nuestro estudio) (10). También existen diferencias significativas en el grado de proliferación tumoral, ya que el 57% de los casos en mujeres presentan un grado de proliferación bajo ( $Ki-67 < 15\%$ ) (11), lo que duplica ampliamente el porcentaje hallado en nuestro estudio (23%). Esto parece indicar que los varones consultan antes por la aparición de un bulto en la mama (dado que destaca a un tamaño menor). De la misma forma, para que un tumor mamario dé clínica en el varón parece que tiene que haber proliferado más que en la mujer, y puede haberse extendido por tanto por mayor territorio. También es posible que se detecten más estadios precoces en la mujer debido a los programas de cribado del cáncer de mama.

En cuanto a la clasificación del cáncer de mama por subtipos moleculares, en mujeres el más frecuente es el luminal A (un 74% de los casos), seguido del “triple negativo” (12%), el luminal B (10%) y el HER2+ (4%) (12). En nuestro estudio destaca que el 100% de los pacientes expresa el subtipo luminal, distribuyéndose de forma similar entre luminal A (55%) y luminal B (45%). El incremento de CMV subtipo luminal B concuerda con la hipótesis de una mayor proliferación durante el periodo pre-consulta en varones. No obstante, la sobreexpresión de receptores hormonales en nuestros pacientes parece conllevar una clara implicación de los estrógenos y la progesterona en la patogenia del CMV. Es posible que si incrementásemos el tamaño muestral hallaríamos otros subtipos de CMV; sería necesario un estudio mayor para confirmarlo.

La evolución clínica también es similar a lo publicado para el cáncer de mama en mujeres, ya que un 23% de las mismas sufren recaída, frente al 19% de nuestros varones (13).

Sobre el estado de los genes relacionados con el síndrome de mama y ovario familiar, en estudios previos realizados en esta Unidad a pacientes pertenecientes a familias con alto riesgo de padecer cáncer de mama hereditario se hallaron mutaciones en un 32% de las pacientes estudiadas, siendo el 46% descritas en BRCA1 y el 54% restante en BRCA2. De todas ellas, sólo el 17,2% resultaron ser mutaciones patogénicas, distribuidas de forma prácticamente equitativa entre los genes BRCA1 y BRCA2 (47% y 53% de las mutaciones patogénicas, respectivamente). Asimismo, de todas las mutaciones encontradas fueron clasificadas como variantes de significado incierto el 31,4% de las mutaciones halladas en BRCA1 y el 25,4% de las mutaciones halladas en BRCA2 (14). El 28% de nuestros pacientes con antecedentes familiares de cáncer de mama presentaron mutaciones en los genes BRCA, siendo todas ellas mutaciones patogénicas localizadas en BRCA2. Esto sugiere que la etiopatogenia del cáncer de mama hereditario en varón está más ligada al gen BRCA2 que a BRCA1. Apoya esta hipótesis el hecho de que el 72% de los pacientes que tenían alguna mutación en nuestro estudio también tenían antecedentes familiares de cáncer de mama; sería necesaria la realización de estudios de asociación para confirmar o descartar esta hipótesis.

## CONCLUSIONES

De la revisión realizada, se derivan las siguientes conclusiones:

1. El CMV tiene una prevalencia baja en la zona de Castilla y León oeste.
2. Las características del CMV de la zona geográfica de Castilla y León oeste son similares a las descritas en otras regiones geográficas.
3. El CMV posee un mayor grado de proliferación a su homólogo en mujer en el momento del diagnóstico.
4. La expresión de receptores hormonales en el cáncer de mama es mayor en varones que en mujeres.
5. Existen diferencias a nivel genético entre los pacientes con CMV familiar y las pacientes mujeres con cáncer de mama familiar, por lo que probablemente la base etiopatogénica del CMV familiar esté más ligada al gen BRCA2 que el cáncer de mama hereditario en mujer.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Fact Sheets by Cancer [Internet]. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [citado 24 de abril de 2017]. Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
2. Yalaza M, Inan A, Bozer M. Male Breast Cancer. J Breast Heal [Internet]. 2016 [citado 28 de abril de 2017];12(1):1-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28331724>
3. Anderson WF, Althuis MD, Brinton LA, Devesa SS. Is Male Breast Cancer Similar or Different than Female Breast Cancer? Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2004 [citado 24 de abril de 2017];83(1):77-86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14997057>
4. Borgen PI, Wong GY, Vlamis V, Potter C, Hoffmann B, Kinne DW, et al. Current management of male breast cancer. A review of 104 cases. Ann Surg [Internet]. 1992 [citado 28 de abril de 2017];215(5):451-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319699>
5. PDQ Adult Treatment Editorial Board PATE. Male Breast Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version [Internet]. Bethesda: National Cancer Institute (US); 2002 [citado 24 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389234>
6. Guerra J, Moreno F, Oncosur. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer de Mama: guía clínica [Internet]. Madrid: Fundación Médica Mutua Madrileña; 2007 [citado 24 de abril de 2017]. Disponible en: [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia\\_clinica\\_oncosur\\_cancermama.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupocooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_cancermama.pdf)
7. Green M, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Internet]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012 [citado 28 de abril de 2017]. 2028 p. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901616061>
8. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H.

- Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2005 [citado 5 de mayo de 2017];7(4):R465-9. Disponible en: <https://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr953>
9. Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma. *Cancer* [Internet]. 2006 [citado 5 de mayo de 2017];106(4):743-50. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.21659>
  10. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer* [Internet]. 2007 [citado 7 de mayo de 2017];109(9):1721-8. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.22618>
  11. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2013 [citado 7 de mayo de 2017];139(2):539-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674192>
  12. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2016 [citado 5 de mayo de 2017];66(1):31-42. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21320>
  13. Nowikiewicz T, Wiśniewska M, Wiśniewski M, Biedka M, Głowacka I, Kozak D, et al. Overall survival and disease-free survival in breast cancer patients treated at the Oncology Centre in Bydgoszcz - analysis of more than six years of follow-up. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)* [Internet]. 2015 [citado 7 de mayo de 2017];19(4):284-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26557776>
  14. Rubio Rodrigo M. Nuevas aportaciones a la caracterización de genes de susceptibilidad en cáncer de mama [Tesis doctoral]. [Salamanca]: Universidad de Salamanca; 2008.



15. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2002 [citado 28 de abril de 2017];30(12):e57. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12060695>

## ANEXO 1: Extracción de DNA genómico

El DNA genómico de alto peso molecular se extrajo a partir de sangre periférica de los pacientes.

Tras centrifugar la muestra de sangre periférica se aisló la interfase de células leucocitarias, que se resuspendieron en tampón Fornace (0.25M sacarosa; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 25 mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5M pH 8, que es un quelante de iones divalentes que posibilita la inactivación de las nucleasas; proteinasa K 20 mg/L, que degrada las proteínas; y SDS (dodecil sulfato sódico) al 10%, que rompe las membranas celulares. Esta mezcla se incubó a 55° C durante unas 16 horas, tras lo cual se purificó el DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1) y centrifugando posteriormente para aislar las fases. Con este tratamiento el DNA queda en la fase acuosa, que se limpió de otros residuos mezclándola, de nuevo, con CIAA y centrifugando para separar las dos fases, una que contiene el DNA y otra que contiene los detritos celulares. Tras este paso se añadió etanol absoluto frío a la fase acuosa, precipitando el DNA, que se recuperó, se lavó con etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió en agua desionizada. La muestra de DNA se almacenó en tubos eppendorff a -20° C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del DNA como la posible contaminación.

La concentración y el grado de contenido proteico de DNA se calcula tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro automático de DNA/RNA (GeneQuant, Pharmacia), siguiendo la fórmula:

$$\mu\text{g de DNA /ml} = (\text{DO } 260) \times (\text{factor de dilución}) \times 50$$

(Nota: 50 es un factor de corrección introducido, ya que la unidad de densidad óptica con una luz incidente de 260 nm es un valor de absorbancia que tiene 50 µg de DNA / ml).

El cociente DO<sub>260</sub> / DO<sub>280</sub> se utiliza para determinar el grado de contaminación proteica, considerándose como valores adecuados un cociente entre 1.65 y 2. Valores inferiores a los señalados indican contaminación por proteínas o solventes orgánicos; en estos casos, se procedió a realizar una nueva purificación del DNA. Valores superiores indican un exceso de RNA, que se elimina tratando la solución de DNA con RNAsa y purificando de nuevo, según el método descrito anteriormente (Sambrook et al., 1989) (7).

## ANEXO 2: Protocolo de realización de PCR para estudio de BRCA1

### MATERIAL NECESARIO

- Puntas de filtro
- Guantes
- Micropipetas
- Tubos de 0.2  $\mu\text{L}$
- Gradilla
- Rotulador permanente
- Tubos de 2.5  $\mu\text{L}$

### LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio pre-PCR en campana de flujo laminar.

### REACTIVOS NECESARIOS

- Master-mix 5'Prime Eppendorf® (Ref: 733-0113)
- Mezcla de oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) (10ng/ $\mu\text{L}$ ) (Tabla 3)
- H<sub>2</sub>O bidestilada o milliQ
- DNA (concentración final 10-200ng)

### PROCEDIMIENTO

La concentración Master-mix 5'Prime Eppendorf® ha de ser 1X. El volumen a pipetear dependerá por lo tanto del volumen final de PCR que se desee preparar.

**Tabla 1.**

	Volumen final 12.5 $\mu\text{L}$	Volumen final 25 $\mu\text{L}$	Volumen final 50 $\mu\text{L}$
Master-mix 2.5X	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Oligonucleótidos F+R	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
DNA	1.5 $\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$	6 $\mu\text{L}$

Colocarse guantes sin usar y trabajar dentro de la campana de flujo laminar a partir de este momento.

Rotular adecuadamente los tubos de PCR (0.2  $\mu\text{L}$ ) colocados para ello en una gradilla adecuada. Uno de los tubos se rotulará como control negativo (C-).

Calcular el volumen necesario de cada reactivo (excepto el DNA) en función del número de muestras que sea necesario preparar. Para ello se multiplicará la cantidad indicada en la tabla 1 por el número de muestras más una.

Mezclar en un tubo de 2.5 µL la cantidad necesaria utilizando la micropipeta que se adecue mejor al volumen que sea necesario pipetear. Darle a la mezcla (mezcla de PCR) un vortex y un spin.

Dispensar en los tubos previamente rotulados el volumen adecuado de mezcla de PCR. Cerrar bien los tubos.

Añadir el volumen adecuado de DNA (tabla 1) a cada tubo. Abrir únicamente el tubo correspondiente al DNA que se va a añadir (para minimizar el riesgo de contaminación). En el caso del tubo del control negativo añadir esa misma cantidad de H<sub>2</sub>O. Asegurarse de cerrar bien todos los tubos (para evitar la pérdida de volumen de reacción por evaporación). Dar un spin a los tubos.

Colocarlos en el termociclador y aplicar el programa adecuado.

**Tabla 2. Programas de PCR para los exones de BRCA1**

EXONES 2,11A, 11B, 11C, 11G, 20, 23 y 24 (PROGRAMA 1A):			
•	5'	95°C	
•	30"	95°C	} 30 CICLOS
•	30"	56°C	
•	30"	72°C	
•	7'	72°C	
EXONES 3, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21 y 22 (PROGRAMA 1D):			
•	5'	95°C	
•	30"	95°C	} 30 CICLOS
•	30"	54°C	
•	30"	72°C	
•	7'	72°C	
EXONES 7, 11E, 11F y 11D (PROGRAMA 2a):			
•	5'	95°C	
•	30"	95°C	} 30 CICLOS*
•	30"	56°C	
•	30"	72°C	
•	7'	72°C	
*(disminución de la temperatura 0.3°C por ciclo)			

## ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE PCR

**Se realizará en un laboratorio post-PCR.**

El análisis se realizará mediante electroforesis en gel de agarosa realizado en TBE 0.5X. El gel se realizará a un porcentaje comprendido entre el 1.5 y el 2%. En la tabla 3 aparecen los tamaños correspondientes a cada uno de los fragmentos de amplificación del gen.

**Tabla 3: secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de cada exón de BRCA1 y tamaño del fragmento que generan.**

BRCA1			
EXÓN	CEBADOR SENTIDO (Fwd.)	CEBADOR ANTISENTIDO (Rev.)	Tamaño del fragmento amplificado
2	5'-GACGTTGTCAATTAGTTCTTTGG-3'	5'-GGTCAATTCTGTTCAATTGC-3'	315 pb
3	5'-AACGAACCTTGAGGCCTTATG-3'	5'-TTGGATTTTCGTTCTCACTT-3'	308 pb
5	5'-CTCTTAAGGGCAGTTGTGAG-3'	5'-ATGGTTTTATAGGAACGCTATG-3'	278 pb
6	5'-CTTATTTTAGTGTCTTAAAGG-3'	5'-GGTCTTATCACCACGTCATAG-3'	251 pb
7	5'-CACAACAAAGAGCATACATAGGG-3'	5'-AGGAGGACTGCTTCTAGCCTG-3'	350 pb
8	5'-GGTGTCAAGTTTCTCTCAGG-3'	5'-AATCCAGCAATTATTATTAATAC-3'	230 pb
9	5'-GAATATCTGTTTTCAACAAGTACA-3'	5'-TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA-3'	179 pb
10	5'-GATCTTGGTCATTTGACAGTTC-3'	5'-CCCAAATGGTCTTCAGAATA-3'	240 pb
11 <sup>a</sup>	5'-AGTTGGTTGATTTCACCTC-3'	5'-AGCCTCATGAGGATCACTGG-3'	739 pb
11B	5'-ATTGCTCCGTTTTCAAATC-3'	5'-CGGCTAATTGTGCTCACTGT-3'	480 pb
11C	5'-CTGAAGTTAACAAATGCACCTGG-5'	5'-TTCCTTAAGGACCCAGAGTGG-3'	584 pb
11D	5'-TCCAAGTACAGTGAGCACAATTA-3'	5'-AACAAGTGTGGAAGCAGGG-3'	633 pb
11E	5'-TTTGCCAGTTCAAAAGACTCC-3'	5'-CTCTTGAAGGCTAGGATTGA-3'	620 pb
11F	5'-GCCAAAGTAGCTGATGTATTGG-3'	5'-ATTCATCACTTGACCATTCTGC-3'	423 pb
11G	5'-AGGGGCCAAGAAATAGAGT-3'	5'-GTGCTCCCAAAAGCATAAA-3'	564 pb
12	5'-GCGTTTATAGTCTGCTTTTACA-3'	5'-TGTCAGCAAACCTAAGAATGT-3'	227 pb
13	5'-AATGGAAGCTTCTCAAAGTA-3'	5'-TGTTGGAGCTAGGTCCTTAC-3'	319 pb
14	5'-TTTGTGTATCATAGATTGATGC-3'	5'-AACAAAGAAGTATCCTAGAGC-3'	387 pb
15	5'-CAGACTTCTAGGCTGTCTGC-3'	5'-GTGTTTGTCCAATACAGCAG-3'	378 pb
16	5'-AATTCTTAACAGAGACCAGAAC-3'	5'-AAAACCTTTCCAGAATGTTGT-3'	450 pb
17	5'-AGCTGTGTGCTAGAGGTAATC-3'	5'-GTGGTTTTATGCAGCAGATG-3'	190 pb
18	5'-ATCCAGATTGATCTTGGGAG-3'	5'-CTCAGACTCAGCATCAGC-3'	312 pb
19	5'-ATCTCCGTGAAAAGAGC-3'	5'-CATTGTTAAGGAAAGTGGAGCA-3'	208 pb
20	5'-ATATGACGTGTCTGCTCCAC-3'	5'-TGCAAGGGGAGTGGAATAC-3'	229 pb
21	5'-AAGCTCTCTCTTTTGAAGTC-3'	5'-GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT-3'	298 pb
22	5'-AGTGTAGGGTAGAGGGCCTG-3'	5'-AGTCTTGCTCAGGAGAGA-3'	207 pb
23	5'-CAGAGCAAGACCCTGTCTC-3'	5'-ACTGTGCTACTCAAGCACCA-3'	255 pb
24	5'-ATGAATTGACACTAATCTCTGC-3'	5'-GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA-3'	280 pb

## ANEXO 3: Protocolo de realización de PCR para estudio de BRCA2

### MATERIAL NECESARIO

- Puntas de filtro
- Guantes
- Micropipetas
- Tubos de 0.2  $\mu$ L
- Gradilla
- Rotulador permanente
- Tubos de 2.5  $\mu$ L

### LUGAR DE REALIZACIÓN

Laboratorio pre-PCR en campana de flujo laminar

### REACTIVOS NECESARIOS

- DNA AmpliTool Master Mix (Biotools. Ref: 4558)
- Mezcla de oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) (10ng/ $\mu$ L) (Tabla 3)
- H<sub>2</sub>O bidestilada o milliQ
- DNA (concentración final 10-200ng)

### PROCEDIMIENTO

La concentración final del reactivo mastermix VWR ha de ser 1X. El volumen a pipetear dependerá por lo tanto del volumen final de PCR que se desee preparar.

**Tabla 1.**

	Volumen final 13 $\mu$ L	Volumen final 26 $\mu$ L	Volumen final 52 $\mu$ L
Ampli Tools Master mix 2X	6.5 $\mu$ L	13 $\mu$ L	26 $\mu$ L
Oligonucleótidos F+R	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L	4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3.5 $\mu$ L	7 $\mu$ L	14 $\mu$ L
DNA	2 $\mu$ L	4 $\mu$ L	8 $\mu$ L

Colocarse guantes sin usar y trabajar dentro de la campana de flujo laminar a partir de este momento.

Rotular adecuadamente los tubos de PCR (0.2  $\mu$ L) colocados para ello en una gradilla adecuada. Uno de los tubos se rotulará como control negativo (C-).

Calcular el volumen necesario de cada reactivo (excepto el DNA) en función del número de muestras que sea necesario preparar. Para ello se multiplicará la cantidad indicada en la tabla 1 por el número de muestras más una.

Mezclar en un tubo de 2.5 µL la cantidad necesaria utilizando la micropipeta que se adecue mejor al volumen que sea necesario pipetear. Darle a la mezcla (mezcla de PCR) un vortex y un spin.

Dispensar en los tubos previamente rotulados el volumen adecuado de mezcla de PCR. Cerrar bien los tubos.

Añadir el volumen adecuado de DNA (tabla 1) a cada tubo. Abrir únicamente el tubo correspondiente al DNA que se va a añadir (para minimizar el riesgo de contaminación). En el caso del tubo del control negativo añadir esa misma cantidad de H<sub>2</sub>O. Asegurarse de cerrar bien todos los tubos (para evitar la pérdida de volumen de reacción por evaporación). Dar un spin a los tubos.

Colocarlos en el termociclador y aplicar el programa adecuado.

#### PROGRAMAS DE PCRs PARA LOS EXONES DE BRCA 2

EXONES 11S, 15 y 20 (PROGRAMA 2.20):		
• 5'	95°C	} 40CICLOS
• 30"	95°C	
• 30"	50°C	
• 30"	72°C	
• 7'	72°C	
EXONES 2, 3, 4, 5-7, 8, 9, 10A, 10B, 10E, 11A, 11C, 11D, 11E, 11G, 11I, 11M, 11P, 11R, 11U, 11W, 11Y, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23-24, 25, 26, 27A y 27B(PROGRAMA 2a):		
• 5'	95°C	} 30 CICLOS*
• 30"	95°C	
• 30"	56°C	
• 30"	72°C	
• 7'	72°C	
*(disminución de la temperatura 0.3°C por ciclo)		

#### ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS DE PCR

**Se realizará en un laboratorio post-PCR.**

El análisis se realizará mediante electroforesis en gel de agarosa realizado en TBE 0.5X. El gel se realizará a un porcentaje comprendido entre el 1.5 y el 2%. En la tabla 3 aparecen los tamaños correspondientes a cada uno de los fragmentos de amplificación del gen.

**Tabla 2: secuencia de cebadores empleados para la amplificación de cada exón de BRCA2 y tamaño del fragmento que generan.**

BRCA2			
EXÓN	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENIDO	Tamaño del fragmento amplificado
2	5'-CTCAGTCACATAATAAGGAAT-3'	5'-ACACTCTGACGTACTGGGTTTT-3'	256 pb
3	5'-TCTGGGTCACAAATTTGTCTGTCA-3'	5'-TTCCTAGTTTGTAGTTCTCCCGAGTC-3'	356 pb
4	5'-AGAATGCAAATTTATAATCCAGAGTA-3'	5'-AATCAGATTCATCTTTATAGAACAAA-3'	249 pb
5,6,7	5'-AACAAATTTATATGAATGAGAATC-3'	5'-AACAGAAGTTATTAGAGATGAC-3'	686 pb
8	5'-AATAGTAGATGTGCTTTTTGA-3'	5'-ACATATAGGACCAGGTTTAGAGAC-3'	285 pb
9	5'-CTAGTGATTTTAACTATAATTTTG-3'	5'-GTTCAACTAAACAGAGGACT-3'	164 pb
10A	5'-TATAAAATATTAATGTGCTTCTGTT-3'	5'-AAAGGGCTTCTGATTGCTAC-3'	374 pb
10B	5'-ATCTGAAGTGGAACCAATGATAC-3'	5'-GTGGATATTAACTGCATTCTTCAA-3'	681 pb
10E	5'-TATGTCCAAATTTAATTGATAAT-3'	5'-AAACACAGAAGGAATCGTCATC-3'	320 pb
11A	5'-GATGGTACTTTAATTTTGCACTTTG-3'	5'-TTTCATGATCATATAAAAGAC-3'	425 pb
11C	5'-CAAAAGTGGAATACAGTGATAC-3'	5'-ATAATTTTCATTTAAAGCACATACAT-3'	254 pb
11D	5'-TCTAGAGGCAAAGAATCATA-3'	5'-TCATTGTCTGAGAAAAGTTC-3'	305 pb
11E	5'-TTCAAAAATAACTGTCAATCC-3'	5'-CTGAAGCTACCTCCAAAAGTGTG-3'	430 pb
11G	5'-ACAAATGGGCAGGACTCTTAGG-3'	5'-GCTGCTGTCTACCTGACCAA-3'	566 pb
11I	5'-GATGCTGATCTTCATGTCATAA-3'	5'-AAAAAGTTAAATCTGACAAATCT-3'	688 pb
11M	5'-TTTATGAAGGAGGGAAACACTCA-3'	5'-CATTGATGGCTAAAAGTGTG-3'	575 pb
11P	5'-TCATACAGCTAGCGGGAAAAA-3'	5'-AATGACTGAATAAGGGGACTGAT-3'	421 pb
11R	5'-GTCCTGCAACTTGTACAC-3'	5'-GATTTTGTGCTTTTCAGC-3'	243 pb
11S	5'-AACCAGAAAGAATAAATACT-3'	5'-ATTTTTGATTATTCTCGTTGTT-3'	550 pb
11U	5'-AAGACATATTTACAGACAGT-3'	5'-TTGGGATATTAATGTTCTGGAGTA-3'	539 pb
11W	5'-AAAGTAACGAACATTGACCA-3'	5'-GTGAGACTTTGGTTCCTAAT-3'	468 pb
11Y	5'-TTCAACAAGACAAACAACAGT-3'	5'-AGCATACCAAGTCTACTGAATAAAC-3'	443 pb
12	5'-AGGTCATATTGTGTGAAG-3'	5'-AGTGGCTCATGTCTGTAAT-3'	358 pb
13	5'-TAAAGCCTATAATTGTCTCA-3'	5'-CTTCTTAACGTTAGTGTCATT-3'	271 pb
14	5'-ATGTAGCAAATGAGGGTCTG-3'	5'-CAAAGGGGGAAAACCATCAG-3'	609 pb
15	5'-GGCCAGGGGTTGTGCTTTT-3'	5'-AGGATACTAGTTAATGAAATA-3'	314 pb
16	5'-TTTGGTAAATTCAGTTTGGTTT-3'	5'-AACACACAATCTTTTGCATAGA-3'	330 pb
17	5'-CAGAGAATAGTTGTAGTTGTTGAA-3'	5'-AGAAACCTTAACCCATACTGC-3'	306 pb
18	5'-ATTCAGTTTTATTCTCAGTTATTC-3'	5'-TTTAACTGAATCAATGACTG-3'	500pb
19	5'-AAGTGAATATTTTAAAGGCAGTT-3'	5'-TATATGGTAAGTTTCAAGAAT-3'	249 pb
20	5'-CACTGTGCCTGGCCTGATAC-3'	5'-ATGTTAAATTCAAAGTCTCTA-3'	296 pb
21	5'-GGGTGTTTTATGCTTGGTTCT-3'	5'-CATTTCAACATATTCCTCCTG-3'	304 pb



22	5'-TTTTGTTCTGATTGCTTTTTATTC-3'	5'-AATCATTTTGTAGTAAGGTCAT-3'	314 pb
23-24	5'-ACTTCTTCCATTGCATCTTTCTCA-3'	5'-AGCTCCAATAATCATAAGA-3'	520 pb
25	5'-TAAAATTCATCTAACACATCTAT-3'	5'-ATTCCCCATTCCCCATCT-3'	450 pb
26	5'-AAGGAAATACTTTTGAAACATAA-3'	5'-TTTACTAGGTATACAAACAGAA-3'	299 pb
27A	5'-TAGGAGTTAGGGGAGGGAGACTGTGT-3'	5'-TTTTTAAATGGAGTCATCTGAGGAGA-3'	462 pb
27B	5'-AAGGCATTCAGCCACCAAGGAGT-3'	5'-GTGGTTTGAAATTATATTCCAGTCTT-3'	450 pb

#### ANEXO 4: Análisis de grandes alteraciones genómicas mediante MLPA

Para el estudio de grandes pérdidas/amplificaciones genómicas de los genes BRCA1 y BRCA2 se empleó la técnica de amplificación por PCR multiplex dependiente de ligación (MLPA). Es un método empleado para establecer el número de copias existente hasta en 45 secuencias de DNA en una única reacción. Consta de cuatro etapas: desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación. (15)

El reactivo de MLPA consta de dos sondas diferentes para cada exón totalmente específicas. Cada una de las sondas lleva incorporado uno de los oligonucleótidos universales empleados para la amplificación final de los fragmentos. Con ello se reduce la inespecificidad de la técnica, puesto que es imprescindible que ambas sondas reconozcan las regiones de unión para que se lleve a cabo la amplificación.

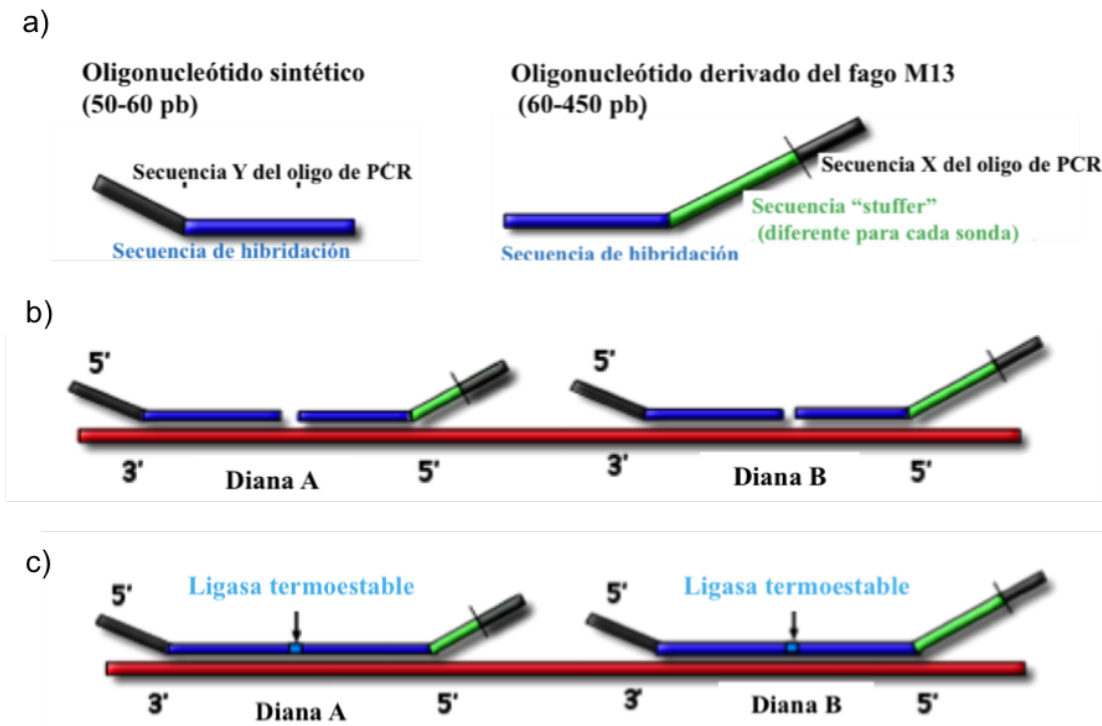


Figura 1: a) esquema de las sondas de MLPA, b) etapa de hibridación de las sondas, c) etapa de ligación de las sondas.

En un primer paso, la mezcla de las sondas de MLPA se añade al DNA genómico desnaturalizado. Las dos partes de la sonda hibridan con secuencias diana adyacentes y las sondas se ligan mediante una enzima ligasa termoestable.

Para amplificar las sondas ligadas se emplea una pareja de oligonucleótidos universales, dando lugar a tantos productos de amplificación como sondas empleadas. Estos productos

se someten a cromatografía capilar y el resultado se visualiza en forma de electroferograma.

Se utilizó para BRCA1 el reactivo comercial “SALSA MLPA KIT P002B BRCA1” (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). El reactivo contiene sondas para todos los exones de BRCA1 salvo el exón 4. La mezcla consta de 34 sondas diferentes, cuyos productos de amplificación varían entre las 127 y 454 pb, así como 7 fragmentos control que generan productos menores de 130 pb. La diferencia entre productos de amplificación consecutivos es de 6 a 9 pb.

Por otro lado, la mezcla de sondas contiene cuatro fragmentos control “DQ” (“DNA quantity”) que dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, y 82 pb. Estos fragmentos sirven de control, ya que serán más evidentes si la cantidad de DNA de nuestras muestras es muy baja. Estos fragmentos no requieren una reacción de ligación para ser amplificados, por lo que son visibles incluso cuando falla la etapa de ligación. Además, en la mezcla encontramos otros fragmentos control “DD” (DNA denaturation”) de 88,92 y 96 pb, que consisten en 2 sondas sintéticas y cuyo propósito es avisarnos de que el DNA no se ha desnaturalizado por completo: el fragmento de 88 pb y el de 96 pb son específicos de secuencias que se localizan en islas CpG muy difíciles de desnaturalizar. Si los productos de amplificación de estos son mucho menores que los de 92 y 127-454 pb, entonces la desnaturalización del DNA de nuestras muestras puede haber sido incompleta y nuestros resultados poco fiables.

En la tabla 1 se recogen las sondas utilizadas para la detección de grandes reordenamientos en el gen BRCA1.

**Tabla 1: sondas de MLPA para el gen BRCA1**

Nombre de la sonda	Longitud en pares de bases	Posición en el gen de las sondas internas	Zona donde liga la sonda (según NM_007294.2 de genebank)	Posición cromosómica de las sondas externas
BRCA1 probe 0763-L0268	148	Exón 1A	160-159 antisentido	
BRCA1 probe 0765-L0270	166	Exón 2	216-217	
BRCA1 probe 0826-L0341	175	Exón 3	303-304	
BRCA1 probe 0767-L0272	184	Exón 5	361-362	
BRCA1 probe 0827-L0342	208	Exón 6	441-442	
BRCA1 probe 0769-L0274	217	Exón 7	605-606	

<b>BRCA1 probe 1004-L0569</b>	226	Exón 8	686-687	
<b>BRCA1 probe 1005-L0581</b>	235	Exón 9	781-782	
<b>BRCA1 probe 0772-L0277</b>	244	Exón 10	821-822	
<b>BRCA1 probe 0830-L0345</b>	268	Exón 11	962-963	
<b>BRCA1 probe 0774-L0279</b>	277	Exón 11	3778-3779	
<b>BRCA1 probe 0775-L0280</b>	286	Exón 12	4345-4346	
<b>BRCA1 probe 2603-L2074</b>	295	Exón 13	4441-4442	
<b>BRCA1 probe 0833-L0349</b>	304	Exón 14	4616-4617	
<b>BRCA1 probe 0778-L0347</b>	328	Exón 15	4750-4751	
<b>BRCA1 probe 0779-L0003</b>	337	Exón 16	4906-4907	
<b>BRCA1 probe 0780-L0283</b>	346	Exón 17	5214-5215	
<b>BRCA1 probe 0781-L0284</b>	355	Exón 18	5294-5295	
<b>BRCA1 probe 0782-L0285</b>	364	Exón 19	5369-5370	
<b>BRCA1 probe 0783-L0356</b>	388	Exón 20	5430-5431	
<b>BRCA1 probe 0784-L0287</b>	397	Exón 21	5504-5505	
<b>BRCA1 probe 0785-L0288</b>	406	Exón 22	5578-5579	
<b>BRCA1 probe 0786-L0289</b>	415	Exón 23	5622-5623	
<b>BRCA1 probe 2831-L2260</b>	424	Exón 24	6242-6243	
<b>BRCA1 probe 0764-L0269</b>	157	Exón 1B	3672-3673 (según la secuencia de genbank L78833)	
<b>Control probe 0797-L0093</b>	127			5q31
<b>Control probe 0662-L0158</b>	136			6p21
<b>Control probe 2946-L3265</b>	198			7q
<b>Control probe 0518-L0098</b>	256			2q14
<b>Control probe 0495-L0303</b>	316			12p12
<b>Control probe 0655-L0304</b>	376			4q26
<b>Control probe 0596-L0083</b>	436			11p13
<b>Control probe 0678-L0124</b>	445			12p13
<b>Control probe 0673-L0117</b>	454			3p21
<b>Fragmentos control "DQ"</b>	64,70,76,82			
<b>Fragmentos control "DD"</b>	88,92,96			

Para BRCA2, se utilizó el reactivo comercial “SALSA MLPA KIT P045 BRCA2/CHEK2”. Este reactivo contiene sondas para 25 de los 27 exones codificantes de BRCA2. Hay dos sondas para el exón 1 y el 11, y no hay sondas para los exones 5 y 23 ya que están muy próximos a los exones vecinos y/o son zonas muy ricas en adenina/timina. Como control, se añaden 13 sondas para otros genes localizados en distintos cromosomas, dos de ellas aguas arriba y abajo de BRCA2.

Además, se incluyen tres sondas para el gen CHEK2. Una de ellas solo amplifica en caso de que esté presente la mutación 1100delC. Las otras dos indicarían si hay cambios en el número de copias del gen.

Las sondas tienen productos de amplificación entre 130 y 481 pb, así como 5 fragmentos control que dan lugar a productos de amplificación menores de 130 pb. La mezcla contiene cuatro fragmentos control “DQ” (“DNA quantity”) que dan lugar a productos de amplificación de 64, 70, 76, y 82 pb (igual que para BRCA1). Además, también contiene un producto de amplificación de 92 pb como control de la ligación.

En la tabla 2 se recogen los nombres, posición y longitud de las sondas.

**Tabla 2: sondas de MLPA para el gen BRCA2**

Nombre de la sonda	Longitud en pares de bases	Posición en el gen de las sondas internas	Zona donde liga la sonda	Secuencia de referencia Genbank	Posición cromosómica de las sondas externas
BRCA2 probe 2283-L01774	139	Exón 1	Región promotora	Z74739	
BRCA2 probe 2285-L01776	148	Exón 1	Región promotora	Z74739	
BRCA2 probe 2486-L01985	166	Exón 2	271-270 antisentido	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1599-L1181	175	Exón 3	472-473	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1600-L1182	193	Exón 4	570-571	NM_000059.1	
BRCA2 probe 4585-L03983	346	Exón 6	728-727 reverse	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1601-L01183	202	Exón 7	765-766	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1602-L01184	220	Exón 8	236-237	X95158.1	
BRCA2 probe 1603-L01185	229	Exón 9	1001-1002	NM_000059.1	
BRCA2 probe 1604-L01186	247	Exón 10	1374-1375	NM_000059.1	
BRCA2 probe 2279-L01770	256	exón 11	2192-2193	NM_000059.1	

<b>BRCA2 probe 1606-L01188</b>	274	exón 11	6992-6993	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1607-L01189</b>	283	Exón 12	297-298	X95162.1	
<b>BRCA2 probe 2280-L01771</b>	301	Exón 13	7216-7215 antisentido	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1609-L01191</b>	310	Exón 14	7245-7246	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1610-L01192</b>	328	Exón 15	7762-7763	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1611-L01193</b>	337	Exón 16	7975-7976	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 2281-L01772</b>	355	Exón 17	8158-8157 antisentido	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1613-L01195</b>	364	Exón 18	8482-8483	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1614-L01196</b>	382	Exón 19	8602-8603	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1615-L01197</b>	391	Exón 20	8788-8789	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 2069-L01970</b>	409	Exón 21	8909-8910	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1617-L01199</b>	418	Exón 22	9100-9101	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1618-L01200</b>	436	Exón 24	9408-9409	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 5090-L4508</b>	445	Exón 25	9655-9666	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 4586-L03984</b>	463	Exón 26	9786-9787	NM_000059.1	
<b>BRCA2 probe 1621-L1203</b>	472	Exón 27	10094-10095	NM_000059.1	
<b>CG018 probe 2144-L01619</b>	454				Aguas abajo de BRCA2
<b>FRY probe 2143-L1618</b>	161				Aguas arriba de BRCA2
<b>CHEK2 probe 2578-L2040</b>	265				Región promotora de CHEK2 en 22q
<b>CHEK2 probe 2579-L2041</b>	400	Exón 9			22q
<b>CHEK2 probe 1772-L1336</b>	490	Exón 11	Específica para detectar 1100delC		22q
<b>Control probe 0681-L0154</b>	373				4
<b>Control probe 1217-L00694</b>	184				4
<b>Control probe 0797-L0463</b>	130				5q31
<b>Control probe 1344-L00555</b>	211				9
<b>Control probe 0517-L00097</b>	238				2
<b>Control probe 0990-L00567</b>	292				11
<b>Control probe 2144-L01619</b>	400				13
<b>Control probe 1240-L0787</b>	427				8

<b>Control probe 1042-L0791</b>	319				8
<b>Control probe 1060-L00628</b>	481				17
<b>Synthetic control probe</b>	92				2q14
<b>Fragmentos control "DQ"</b>	64,70, 76,82				

Se aplicó el protocolo recomendado por el fabricante, con una etapa de hibridación a 60° C durante 16 horas, una de ligación a 54° C durante 15-20 minutos, y una de polimerización que es la PCR propiamente dicha. En la tabla 3 se recoge el programa de PCR empleado. El volumen final de reacción fueron 40 µL.

**Tabla 3: programa de amplificación de MLPA de los genes BRCA1 y BRCA2**

<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95º C	30''	X 35 ciclos
60º C	30''	
72º C	1'	
72º C	20'	

Para visualizar los resultados se preparó para cada muestra: 12 µl de formamida desionizada, 0.2 µl del marcador de tamaño marcado con el fluorocromo ROX (GeneScan™-500, Applied Biosystems) y 1 ml del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador ABI Prism 3700 (PE Applied Biosystems) y se visualizaron los resultados mediante el software GeneScan 3.5. El análisis se realiza mediante comparación del electroferograma obtenido de cada muestra y uno procedente de un control. La pérdida de una copia de la secuencia de un exón supone una reducción del 35-55% del área relativa del pico de amplificación. La ganancia de 2 a 3 copias de la secuencia estudiada da lugar a un incremento del 30-55% en el área relativa del pico de amplificación. La desviación estándar en el área de cada pico debe ser menor del 10% para todas las sondas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## ANEXO 5: Clasificación TNM del cáncer de mama de la UICC

**Tabla 1: Tumor primario (T)**

Tx	El tumor primario no puede ser evaluado	
T0	No evidencia de tumor primario	
Tis	Carcinoma in situ	
T1	Tumor de 2 cm o menos de dimensión mayor	
	T1mic	Microinvasión de 0,1 cm o menos de dimensión máxima
	T1a	Tumor de más de 0,1 cm pero no más de 0,5 cm de dimensión máxima
	T1b	Tumor de más de 0,5 cm pero no más de 1 cm de máxima dimensión
	T1c	Tumor de más de 1 cm pero no más de 2 cm de máxima dimensión
T2	Tumor de más de 2 cm pero no más de 5 cm de máxima dimensión	
T3	Tumor de más de 5 cm de máxima dimensión	
T4	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o la piel	
	T4a	Extensión a pared torácica (no se incluye el músculo pectoral)
	T4b	Edema (incluyendo piel de naranja) o ulceración de la piel de la mama, nódulos cutáneos satélites confinados a la misma mama
	T4c	T4a + T4b
	T4d	Carcinoma inflamatorio

**Tabla 2: Ganglios linfáticos regionales (N)**

NX	No pueden evaluarse (por ejemplo, previamente resecados)	
N0	No metástasis en ganglios regionales	
N1	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales móviles	
N2	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos o adheridos entre sí, o en ganglios de la mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentesa (en ausencia de metástasis axilares clínicamente evidentes)	
	N2a	Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijos entre sí o a otras estructuras
	N2b	Metástasis únicamente en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes (en ausencia de metástasis axilares clínicamente evidentes)
N3	Metástasis en ganglios linfáticos infraclaviculares ipsilaterales, o en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes asociadas a metástasis en ganglios axilares clínicamente aparentes, o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales con o sin simultánea afectación de ganglios axilares y/o de cadena mamaria interna.	
	N3a	Metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales y ganglios axilares
	N3b	Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral y ganglios axilares
	N3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales



**Tabla 3: Ganglios linfáticos regionales (pN)**

pNx	No pueden evaluarse (por ejemplo, previamente resecados o no realizada linfadenectomía)	
pN0	No afectación histológica, no examen adicional para células tumorales aisladas (CTA)	
	pN0 (i-)	No afectación histológica, inmunohistoquímica (IHQ) negativa
	pN0(i+)	No afectación histológica, IHQ positiva pero sin acúmulos celulares mayores de 0,2 mm
	pN0(mol-)	No metástasis histológicas demostradas, hallazgos moleculares negativos (RT-PCR)
	pN0 (mol+)	No metástasis histológicas demostradas, hallazgos moleculares positivos (RT-PCR)
pN1mic	Micrometástasis (mayores de 0,2 mm, pero menores de 2 mm)	
pN1	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y/o metástasis microscópicas en ganglios de la cadena mamaria interna detectadas por biopsia del ganglio centinela pero no clínicamente aparentes	
	pN1a	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares
	pN1b	Metástasis microscópicas en ganglios de la cadena mamaria interna detectadas por biopsia del ganglio centinela, pero no clínicamente aparentes
	pN1c	Metástasis en 1 a 3 ganglios axilares y en ganglios de la cadena mamaria interna con enfermedad microscópica detectada por disección del ganglio centinela, pero no clínicamente aparentes
pN2	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares o en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes en ausencia de metástasis ganglionares axilares	
	pN2a	Metástasis en 4 a 9 ganglios axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2 mm)
	pN2b	Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes, en ausencia de ganglios axilares
pN3	Metástasis en 10 o más ganglios axilares; o en ganglios infraclaviculares; o en ganglios de la cadena mamaria ipsilateral clínicamente aparentes en presencia de afectación de 1 o más ganglios axilares ipsilaterales; o en más de 3 ganglios axilares con afectación microscópica de ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral no clínicamente aparentes; o metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales.	
	pN3a	Metástasis en 10 o más ganglios axilares (al menos un depósito tumoral mayor de 2 mm) o metástasis en ganglios infraclaviculares ipsilaterales
	pN3b	Metástasis en ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral clínicamente aparentes en presencia de afectación de 1 o más ganglios axilares ipsilaterales o en más de 3 ganglios axilares con afectación microscópica de ganglios de la cadena mamaria interna ipsilateral no clínicamente aparentes.

	pN3c	Metástasis en ganglios supraclaviculares ipsilaterales
--	------	--

**Tabla 4: Metástasis distantes (M)**

MX	Desconocidas
M0	No existen
M1	Sí existen

**Tabla 5: Agrupación por Estadios**

0	Tis	N0	M0
I	T1mic	N0	M0
	T1	N0	M0
IIA	T0	N1	M0
	T1mic	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0	N2	M0
	T1mic	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
IIIC	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

*Adaptado de:* Guerra J, Moreno F, Oncosur. Diagnóstico y Tratamiento Cáncer de Mama: guía clínica [Internet]. Madrid: Fundación Médica Mutua Madrileña; 2007 [citado 24 de abril de 2017]. Disponible en: [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupo-cooperativo/2006/oncosur/guia\\_clinica\\_oncosur\\_cancermama.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/colectivos/grupo-cooperativo/2006/oncosur/guia_clinica_oncosur_cancermama.pdf)